

プリオン病のサーベイランスと感染予防に関する調査研究

**V180I 変異を有するプリオン蛋白の生化学的特徴**

研究分担者：三條伸夫	東京医科歯科大学大学院脳神経病態学分野（神経内科）
研究協力者：伊藤陽子	東京医科歯科大学大学院脳神経病態学分野（神経内科）
研究協力者：日詰正樹	埼玉リハビリテーションセンター
研究協力者：小林 篤	北海道大学獣医学研究科比較病理学教室
研究協力者：大上哲也	青森大学薬学部薬学科
研究協力者：佐藤克也	長崎大学運動障害リハビリテーション分野（神経内科学）
研究協力者：浜口 毅	金沢大学医学部脳老化・神経病態学(神経内科学)
研究協力者：山田正仁	金沢大学医学部脳老化・神経病態学(神経内科学)
研究協力者：北本哲之	東北大学病態神経学
研究協力者：水澤英洋	国立精神・神経医療研究センター
研究協力者：横田隆徳	東京医科歯科大学大学院脳神経病態学分野（神経内科）

**研究要旨**

コドン 180 のバリンがイソロイシンに変異する遺伝子異常 Creutzfeldt-Jakob 病(CJD)のみで認められ、本邦の遺伝性プリオン病の約半数を占めている。本研究では、7 例の剖検脳を用いて、コドン 180 の遺伝子変異によりプリオン蛋白におこる生化学的異常を明らかにした。V180I 変異を有する異常プリオン蛋白は、コドン 181 のアスパラギンの糖鎖付加がおこらず、2 型異常プリオン蛋白(Pr<sup>Pres</sup>)よりアミノ基末端が長い断片と、その断片が内部切断を受けて、7-8kDa のアミノ基断片(PrP<sup>7-8</sup>)と、12-13kDa のカルボキシル断片(CTF12/13)になったものの3種類の断片の複合体として検出された。症例によってはそれらの断片に加えて、2 型 Pr<sup>Pres</sup> が種々の割合で含まれていた。それぞれの断片のうち CTF12/13 が量的に最多であった。海馬領域に比べて、相対的に大脳皮質に多量の Pr<sup>Pres</sup> の沈着があり、海綿状変性も強く認められた。本研究結果は V180I 遺伝子変異が、プリオン蛋白に孤発例とは生化学的に異なったメカニズムで異常化をきたしていることを表しており、V180I 変異が遺伝子多型ではなく、病的な変異であることと表していると考えられる。

**A. 研究目的**

遺伝性プリオン病(genetic prion disease; gPrD)はプリオン蛋白遺伝子の変異により正常なプリオン蛋白(PrP<sup>C</sup>)が構造異常を起こし、中枢神経系内で凝集・蓄積することで、急速性に脳の海綿状変化をきたす疾患群である。

これまでに 50 以上の病的な遺伝子変異が確認されており、本邦ではコドン 180 のバリン(V)がイソロイシン(I)へ変異する病型が gPrD の約半数を占めている。V180I は大部分が、孤発性に発症することが知られている。

MM2 型孤発性クロイツフェルト・ヤコブ

病(Creutzfeldt-Jakob disease; CJD)のような緩徐進行性の経過をとり、高齢発症、ミオクローヌスが低頻度であるなど、古典型 CJD とは異なった臨床病型を呈し、髄液検査でも、real-time quaking-induced conversion (RT-QuIC)法による異常プリオン蛋白(PrP<sup>Sc</sup>)や、14-3-3 蛋白の検出率が低いことが報告されている。MRI 拡散強調画像では、後頭葉内側や中心溝付近を除くびまん性的大脑皮質のリボン状の浮腫状の高信号病変が特徴的である。

病理学的特徴として、高度の海綿状変化、神経細胞の比較的維持、軽度のアストログリアの出現、異常プリオン蛋白の免疫組織性染色性が高度に低下していることが報告されており、脳に沈着した異常プリオン蛋白の解析では、V180I-PrP<sup>Pres</sup> の生化学的特徴として、2 型 PrP<sup>Pres</sup> よりわずかに分子量が大きく、2 糖鎖付加型が欠如しており、アミノ基側断片(PrP7-8)が存在すること、「variably protease-sensitive prionopathy (VPSPr)」と同様の糖鎖修飾パターンを有するため、コドン 181 のアスパラギンの糖鎖付加が脳内ではおこらないことが報告されている。

本研究では、V180I 変異を有する PrP<sup>Sc</sup> の生化学的性質を明らかにし、変異遺伝子がおこす蛋白質の異常化のメカニズムについて考察した。

## B. 研究方法

臨床データは 1999 年 4 月から 2016 年 9 月までの本邦のサーベイランスで収集されたデータを使用した。7 例の V180I-gPrD 症例の剖検脳と、比較として、MM1 型孤発性 CJD、MM2 皮質型孤発性 CJD、P102L 変異のある Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease (GSS)、D178N 変異のある fatal familial

insomnia (FFI)、E200K 変異のある家族性 CJD の剖検脳をウエスタン・ブロッティングで解析した。また、剖検脳のパラフィン切片を HE 染色と 3F4 抗体(エピトープ 108-111 番アミノ酸配列に対する抗 PrP<sup>Pres</sup> 抗体)を用いた免疫染色で病理学的解析を行った。

## (倫理面への配慮)

本研究に関して、患者・患者家族に対して説明の上で同意を得ており、東京医科歯科大学倫理審査で承認を受けている (M2000-1456)。

## C. 研究結果

本研究で解析した 7 例の剖検例の平均発症年齢は 81.3 歳で、平均の罹病期間は 29.3 ヶ月であった。各症例の臨床病理所見を表 1 に示した。

ウエスタン・ブロッティングでは孤発性 CJD の脳ホモジュネートと比較して、約 10 倍量の脳ホモジュネートを電気泳動した。既報と同様に、V180I-gPrD 脳では 2 糖鎖付加型 PrP<sup>Pres</sup> は検出されず、無糖鎖付加型 PrP<sup>Pres</sup> の分子量は 2 型 PrP<sup>Pres</sup> より若干高かった(図 1A: 症例 1-3、5)。他の 3 症例のウエスタン・ブロッティングでは、2 型 PrP<sup>Pres</sup> と同じ分子量と思われるバンドがあり、Tohoku2 抗体(2 型 PrP<sup>Pres</sup> 特異的抗体)によりアミノ基断端が 2 型 PrP<sup>Pres</sup> であることを確認した(図 1B; 症例 4、6、7)。転写膜を #71 抗体(カルボキシル断片特異的抗体)でプローブしたところ、新たに 2 本のバンドが検出された。1 本が無糖鎖付加型 PrP<sup>Pres</sup> よりやや分子量が大きいもので、もう 1 本は約 11kDa の小さな断片であった(CTF12/13; 図 1C 白矢印)。この断片は 3F4 抗体や Tohoku2 抗体では認識できなかった。しかし、#71 抗体を使用しても、2 糖鎖付加型 PrP<sup>Pres</sup> や 181 番目のアスパラギンに糖鎖付

加した PrPres は認められなかった。糖鎖切断酵素処理により、このうちの分子量の大きいバンドが消失し、CTF12/13 の量が増えることより、#71 抗体により新たに検出したバンドは、CTF12/13 と 1 糖鎖付加した CTF12/13 であることが確認できた(図 1D)。CTF12/13 は V180I-gPrD 患者の脳で多量に検出され、他のプリオン病患者の脳ではわずかか、検出されなかった(図 1E)。V180I 患者の脳の各部位のホモジュネートをウエスタン・ブロッティングで調べたところ、海綿状変性の強い大脳皮質において、変性の弱い視床に比べ、多量の V180I-PrPres が検出された(図 1F)。

神経病理学的には、びまん性に高度の海綿状変性が大脳皮質(図 2A)で強く見られ、海馬(図 2B)、被殻、視床では変性が相対的に軽度であった。脳葉間での海綿状変性の程度やパターンに差異はなく、重症度分類ではⅢ(高度の変性)が認められた。限局性の海綿状変性を呈している部位が複数認められた(図 2C と D)。脳切片における 3F4 の免疫染色性は極端に弱く、小脳や脳幹には染色性が無かった。アミロイド β 染色では、抗 AB42 抗体によりアミロイドの蓄積が染色されたが、抗 AB40 抗体では染まらなかった。

最後に、それぞれの症例の罹病期間と病理変化の重症度分類を比較検討したところ、罹病期間と病理変化の重症度には相関性がなく、早期から高度の海綿状変性を呈しており、海馬領域の海綿状変化は経年的変化が乏しかった(図 3)。

#### D. 考察

本研究結果より、V180I 変異を有する PrPres は、①様々な比率で 2 型 PrPres と 2 型 PrPres よりアミノ基断端の長いプリオン蛋白(V180I-PrPres)が含まれていること、②既報

で示されているように、1 糖鎖付加が 197 番目のアスパラギンにのみ認められること、③蛋白分解酵素 K 処理に抵抗性の中核となる異常プリオン蛋白の構成が①の PrPres に加え、①が内部切断を受けてアミノ基断端(PrP7-8)とカルボキシル断端(CTF12/13)に分離したものが蓄積しており、CTF12/13 が最多であることが初めて明らかとなった(図 4)。すなわち、V180I-PrPres は①の断片、PrP7-8、そして CTF12/13 の複合体であり、症例によっては 2 型 PrPres が様々な比率で含まれていることが明らかとなった。

さらに、我々の研究で、V180I-PrPres の神経毒性は、V180I-PrPres の蓄積量に比例していることも確認され、蓄積量の多い大脳皮質では蓄積量の少ない海馬領域に比べて高度の海綿状変性をおこしていることが確認された。恐らく、量的な差に加えて、このような複合体形成により、更なる構造変化がおきているために、抗 3F4 抗体に対する免疫原性が高度に低下していることが、脳組織の免疫原性の低下や脳脊髄液の RT-QuIC 法の陽性率の低下に関与していると推測される。そして、そのような生化学的特徴のために、V180I 変異症例は高齢発症で、古典型と比較して、相対的に緩徐な経過を呈すると推測される。

病理学的重症度分類では、罹病期間が最も短い 16 ヶ月の症例において、重症度 V の病理学的重症度に変性が見られ、これは既報の孤発性 CJD では重症度 IV の時期であることより、より変性が強いことを示しており、免疫染色性に反して、強く海綿状変性きたす神経毒性を有していることが示唆される。これらの病理学的変化は、脳に沈着しているアミロイドやタウ蛋白により修飾されていることが推測される。

本研究では、解析できた剖検脳の数少量

である点は注意が必要である。

## E. 結論

V180I 変異を有する異常プリオン蛋白は、コドン 181 のアスパラギンの糖鎖付加がなく、2 型異常プリオン蛋白(PrP<sup>res</sup>)よりアミノ基断端が長い断片と、その断片が内部切断を受けて、7-8kDa のアミノ基断片(PrP7-8)と、12-13kDa のカルボキシル断片(CTF12/13)になったものの 3 種類の断片の複合体であり、症例によっては 2 型 PrP<sup>res</sup> が種々の割合で含まれていた。それぞれの断片のうち CTF12/13 が量的に最多であった。海馬領域に比べて、相対的に大脳皮質に多量の PrP<sup>res</sup> の沈着があり、海綿状変性も強く認められた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Higuma M, Sanjo N, Mitoma H, Yoneyama M, Yokota T. Whole-day gait monitoring in patients with Alzheimer disease: a relationship between attention and gait cycle. *Journal of Alzheimer's Disease Reports* 1(1): 1-8, 2017
- 2) Numasawa Y, Hattori T, Ishiai S, Kobayashi Z, Kamata T, Kotera M, Ishibashi S, Sanjo N, Mizusawa H, Yokota T. Depressive disorder is associated with brainstem infarction involving raphe nuclei. *Journal of Affective Disorders* 213: 191-198, 2017
- 3) Yokote H, Kamata T, Toru S, Sanjo N, Yokota T. Serum retinol levels are associated with brain volume loss in patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* 3(3): 2055217317729688, 2017
- 4) Niino M, Fukazawa T, Kira JI, Okuno T, Mori M, Sanjo N, Ohashi T, Fukaura H, Fujimori J, Shimizu Y, Mifune N, Miyazaki Y, Takahashi E, Kikuchi S, Langdon D, Hb Benedict R, Matsui M. Validation of the Brief International Cognitive Assessment for Multiple Sclerosis in Japan. *Multiple Sclerosis Journal*, 3(4): 2055217317748972, 2017
- 5) Ito Y, Sanjo N, Hizume M, Kobayashi A, Ohgami T, Satoh K, Hamaguchi T, Yamada M, Kitamoto T, Mizusawa H, Yokota T. Biochemical features of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with valine-to-isoleucine substitution at codon 180 on the prion protein gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 496(4): 1055-1061, 2018
- 6) 伊藤陽子、三條伸夫. 遺伝性プリオン病. 特集：プリオン病 その実態に迫る. *Pharma Medica* 35(2): 21-25, 2017
- 7) 三條伸夫. Creutzfeldt-Jakob 病. 特集：認知症 1000 万人時代を目前に控えて. *内科* 120(2): 263-266, 2017
- 8) 三條伸夫、宍戸一原由紀子、三浦義治. PML の基礎疾患の多様性：医原性を含めて. 特集 I / 進行性多巣性白質脳症(PML) 診療の進歩. *神経内科* 87(4): 365-371, 2017
- 9) 平田浩聖、永田哲也、三條伸夫、横田隆徳. 認知症に対する新規治療法の開発：タ

ウを標的にした分子標的治療薬を中心に。

*Dementia Japan* 31: 361-369, 2017

- 10) 三條伸夫. Creutzfeldt-Jakob 病. 第 12 章, In: アルツハイマー病 認知症疾患 臨床医のための実践ガイド. 朝倉書店、当東京、119-123, 2017
- 11) 三條伸夫. 慢性外傷性脳症. 第 13 章, In: アルツハイマー病 認知症疾患 臨床医のための実践ガイド. 朝倉書店、東京、124-130, 2017
- 1) 三條伸夫. 8. 排尿障害・排便障害 (尿失禁・便失禁を含む) の治療はどうするのでしょうか. VIII. 対症療法 In: 神経内科 Clinical Questions & Pearls「中枢脱髄性疾患」. 中外医学社、東京、390-394, 2018

## 2. 学会発表

- 1) Tsukamoto T, Sanjo N, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kitamoto T, Yamada M, Mizusawa H, and Prion Disease Surveillance Committee, Japan. Analysis of cases in which prion disease was denied by the Prion disease Surveillance Committee in Japan in 2016. Asia Pacific Prion Symposium. Melbourne, Oct 20-21, 2017
- 2) Furukawa F, Ae R, Nakamura Y, Hamaguchi T, Yamada M, Tsukamoto T, Mizusawa H, Yokota T, Sanjo N. Analysis of clinical features of patients with lower limb muscle weakness in GSS with P102L mutation. Asia Pacific Prion Symposium. Melbourne, Oct 20-21, 2017 (Hot topics; oral)
- 3) Hamaguchi T, Sakai K, Atsushi K, Kitamoto T, Ae R, Nakamura Y, Sanjo N, Arai K, Koide M, Katada F, Tsukamoto T, Mizusawa H, Yamada M. Investigation of clinical and pathological features of “sporadic Creutzfeldt-Jakob disease” with history of neurosurgery to identify iatrogenic cases. XXIII World Congress of Neurology. Kyoto, Japan, Sep 16- 21, 2017
- 4) Yokote H, Kamata T, Toru S, Sanjo N, Yokota T. Brain volume loss is present in Japanese patients with multiple sclerosis with no evidence of disease activity. XXIII World Congress of Neurology. Kyoto, Sep 16-21, 2017
- 5) Yamada A, Numasawa Y, Hattorri T, Ozaki K, Nishida Y, Ishibashi S, Kanouchi T, Sanjo N, Yokota T. Signal changes of skeletal muscle MRI in peripheral nerve disorders. XXIII World Congress of Neurology. Kyoto, Japan, Sep 16- 21, 2017
- 6) Ichinose K, Ishibashi S, Miyashita A, Sanjo N, Uchida K, Suzuki Y, Sekine M, Kobayashi D, Eishi Y, Yokota T. Clinicopathological features of neuromuscular sarcoidosis and its immunoreactivity profiles of P. acne. XXIII World Congress of Neurology. Kyoto, Sep 16- 21, 2017
- 7) Sakai K, Hamaguchi T, Sanjo N, Murai H, Iwasaki Y, Hamano T, Honma M, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Nakamura Y, Kitamoto Y, Mizusawa H, Yamada M. Diffusion-weighted MR images in dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease. XXIII World Congress of Neurology. Kyoto, Japan,

Sep 16- 21, 2017

- 8) Numasawa Y, Hattori T, Ishiai S, Kobayashi Z, Kamata T, Kotera M, Ishibashi S, Sanjo N, Mizusawa H, Yokota T. Components of depressive disorder due to Raphe-nuclei damage: subclass analysis of patients with brainstem infarction. XXIII World Congress of Neurology. Kyoto, Sep 16-21, 2017
- 9) Furukawa F, Sanjo N, Nishida Y, Matsubara E, Akiba H, Kohei T, Saito T, Saido T, Yokota T. Analysis of Anti-amyloid  $\beta$  Oligomer Antibody Immunoreactivity in APP Knock-in Mice. Alzheimer's Association International Conference 2017, London, UK, Jul 16-20, 2017.
- 10) Yamada M, Hamaguchi T, Taniguchi Y, Sakai K, Kitamoto T, Takao M, Murayama S, Iwasaki Y, Yoshida M, Shimizu H, Kakita A, Takahashi H, Suzuki H, Naiki H, Sanjo N, Mizusawa H. Possible human-to-human transmission of cerebral  $\beta$ -amyloidosis via cadaveric dura mater grafting. Alzheimer's Association International Conference 2017, London, Jul 16-20, 2017
- 11) Furukawa F, Kitamoto T, Nakamura Y, Yamada M, Tsukamoto T, Mizusawa H, Yokota T, Sanjo N. Clinicopathological features of Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome with P105L mutation. Prion 2017. Edinburgh, May 23-26, 2017
- 12) Hamaguchi T, Sakai K, Kobayashi A, Kitamoto T, Ae R, Nakamura Y, Sanjo N, Tsukamoto T, Mizusawa H, Yamada M. Clinical and pathological characterization of "sporadic Creutzfeldt-Jakob disease" with histories of neurosurgery to identify iatrogenic cases. Prion 2017. Edinburgh, May 23-26, 2017
- 13) Yamada M, Hamaguchi T, Sakai K, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Taniguchi Y, Kobayashi A, Takeuchi A, Kitamoto T, Nakamura Y, Sanjo N, Tsukamoto T, Takao M, Murayama S, Iwasaki Y, Yoshida M, Shimizu H, Kakita A, Takahashi H, Suzuki H, Naiki H, Mizusawa H. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease related to dura mater grafts. Prion 2017. Edinburgh, May 23-26, 2017
- 14) Sakai K, Hamaguchi T, Sanjo N, Murai H, Iwasaki Y, Hamano T, Honma M, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Nakamura Y, Kitamoto T, Mizusawa H, Yamada M. Type-dependant diverse extension patterns of hyperintensity on diffusion-weighted MR images in dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease. Prion 2017. Edinburgh, May 23-26, 2017
- 15) 飯嶋真秀、三條伸夫、西田陽一郎、鈴木基弘、横田隆徳. CIDP における Cyclosporine A による IVIg 投与間隔の延長効果の検討. 第 35 回日本神経治療学会総会、2017 年 11 月 16 日、大宮
- 16) 三條伸夫. 学術教育講演、「8. プリオン病」第 36 回日本認知症学会学術集会、2017 年 10 月 25 日、金沢

- 17) 齊藤明日香、三條伸夫、横手裕朗、西田陽一郎、横田隆徳. 病初期から重度の認知機能障害を呈し多発性硬化症と考えられた3症例. 第29回日本免疫学会学術集会、2017年10月6-7日、札幌

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表1

Clinicopathological profile of patients with gCJD-V180I.

Case No.	1	2	3	4	5	6	7
sex	F	F	F	F	M	F	M
Age at disease onset (y.o.)	79	79	79	86	85	84	77
Duration to death (months)	22	54	25	24	16	44	20
Family history	—	—	—	—	—	—	—
apo E	E3/E3	E3/E3	E2/E3	E3/E3	E3/E3	E4/E4	E3/E3
Codon 129	MM	MM	MM	MM	MV	MM	MM
Codon 219	EE	EE	EE	EE	EE	EE	EE
<b>Frontal neocortex</b>							
SC	3	3	3	2-3	3	3	3
GI	3	3	3	3	3	3	3
NR	2-3	3	3-2	2-3	3	3	3
NL	3	3	3	3	3	3	3
CPS	IV-V	V	IV-V	IV-VI	IV-V	V	V
3F4	1	1	1	2	1	2	2
<b>Occipital neocortex</b>							
SC	3	2-3	3	3	2-3	3	3
GI	3	3	3	3	3	3	3
NR	3	2-3	3-2	3	2-3	3	3
NL	2	2	3	3	3	3	3
CPS	IV-VI	IV-V	V	V-VI	III-V	V	V
3F4	0	1	1	2	1	2	1
<b>Hippocampus</b>							
SC	1	2-3	1	2	2	2	2
GI	1	1	1	1	1	1	0
NR	0	2	0	1	1	1	0
NL	0	2	1	0	1	0	0
CPS	I	III	I	II	II	II	II
3F4	2	3	3	2	3	3	2

M: male, F: female, PSWCs: positive sharp wave complexes, CSF: cerebrospinal fluid, MM: methionine homozygous, MV: methionine-valine heterozygous, EE: glutamic acid homozygous, NA: not applicable.

SC, spongiform change; GI, gliosis; NR, neuropil rarefaction; NL, neuron loss; CPS, cortical pathologic staging.

Semiquantitative evaluation method for each pathologic finding.

Spongiform change: no vacuolation (0)/fine small vacuolation with clear boundary (1)/numerous vacuolations with slightly unclear boundary (2)/unclear vacuolation due to surrounding tissue rarefaction (3).

Gliosis: no gliosis (0)/mild gliosis without hypertrophic astrocytosis (1)/moderate gliosis with hypertrophic astrocytosis (2)/severe gliosis (3).

Neuropil rarefaction: no neuropil rarefaction (0)/slight neuropil rarefaction (1)/moderate neuropil rarefaction (2)/severe neuropil rarefaction (3).

Neuron loss: no neuron loss (0)/mild neuron loss (1)/moderate neuron loss (2)/severe neuron loss (3).

Cortical pathologic staging was evaluated according to Iwasaki et al.27.

Immunoreactivity (IR) of PrP (3F4), Aβ40, Aβ42, tau (AT8): no IR (0), few isolated IR (1), mild to moderate IR (2), large amount of IR (3).

图1A

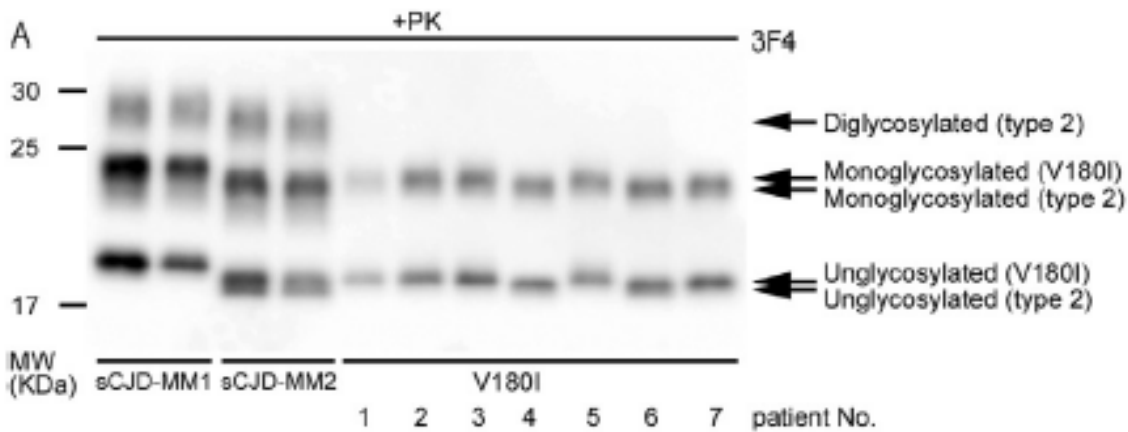




図1B

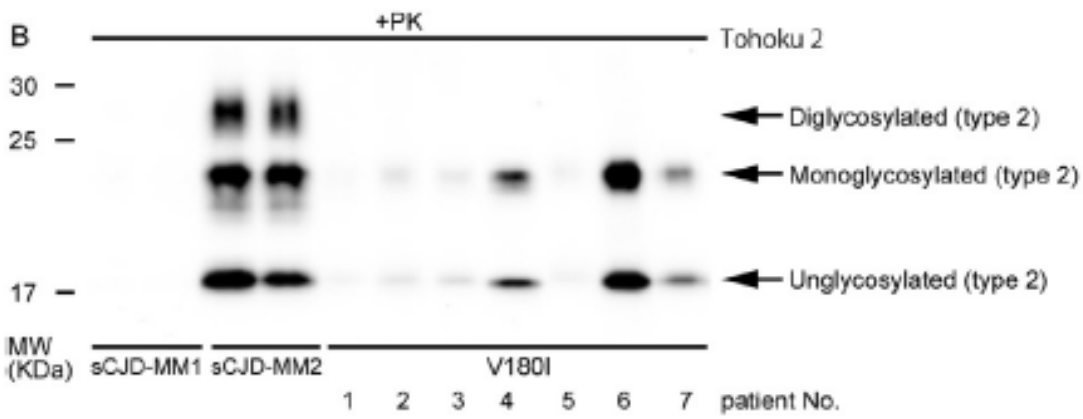


図1C

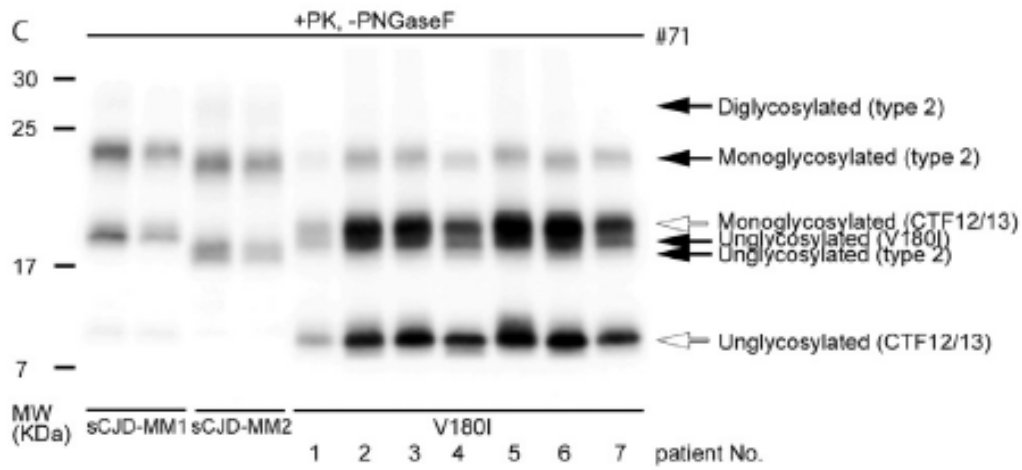


図1D

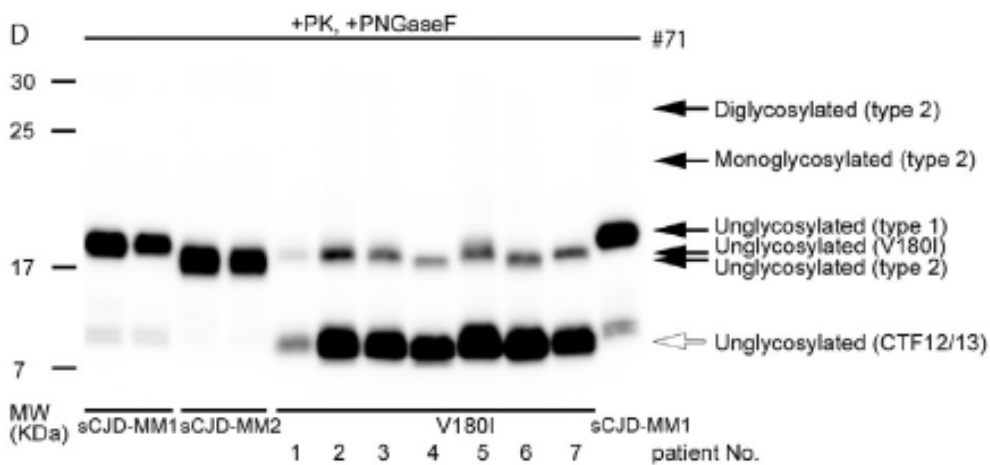


图1E

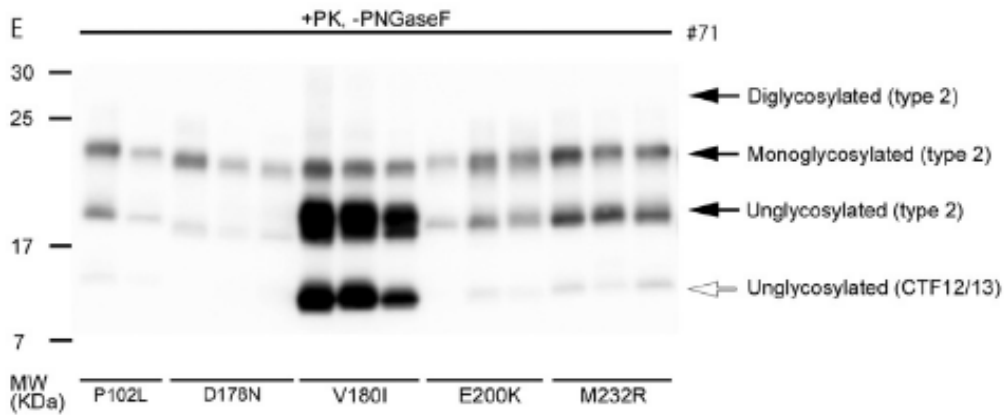


图1F

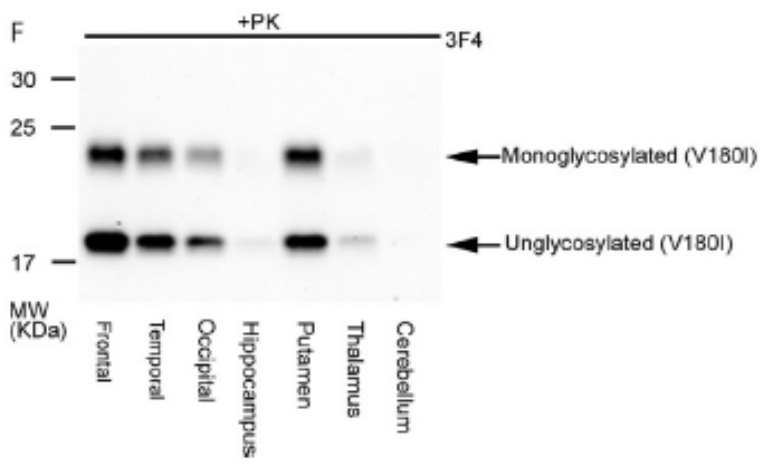


图2

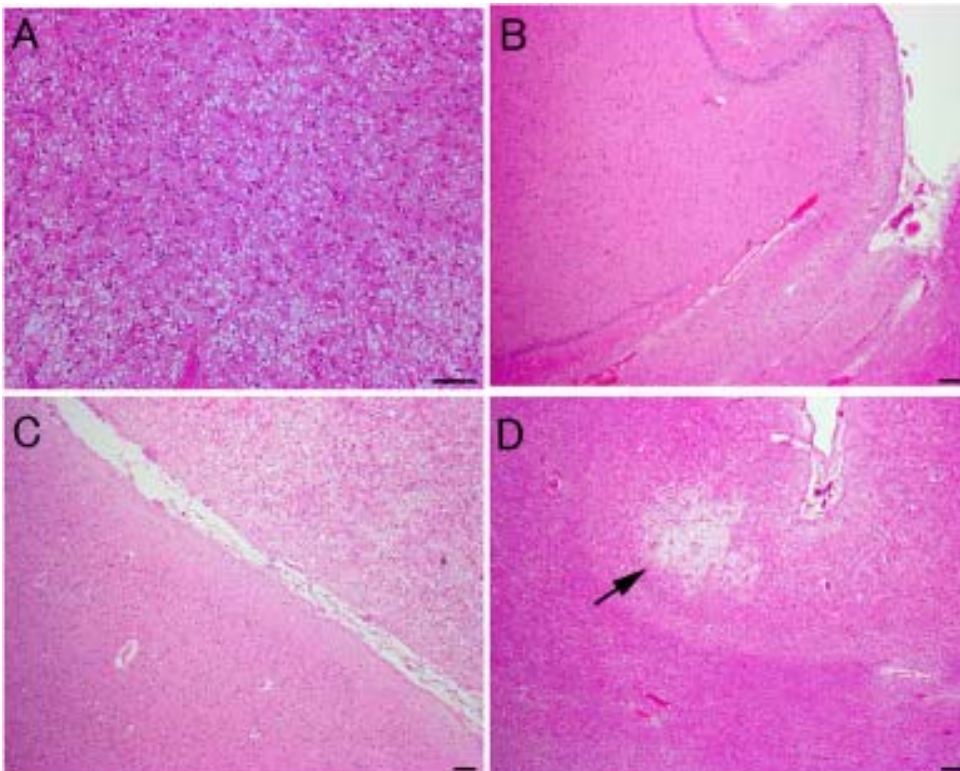


図3

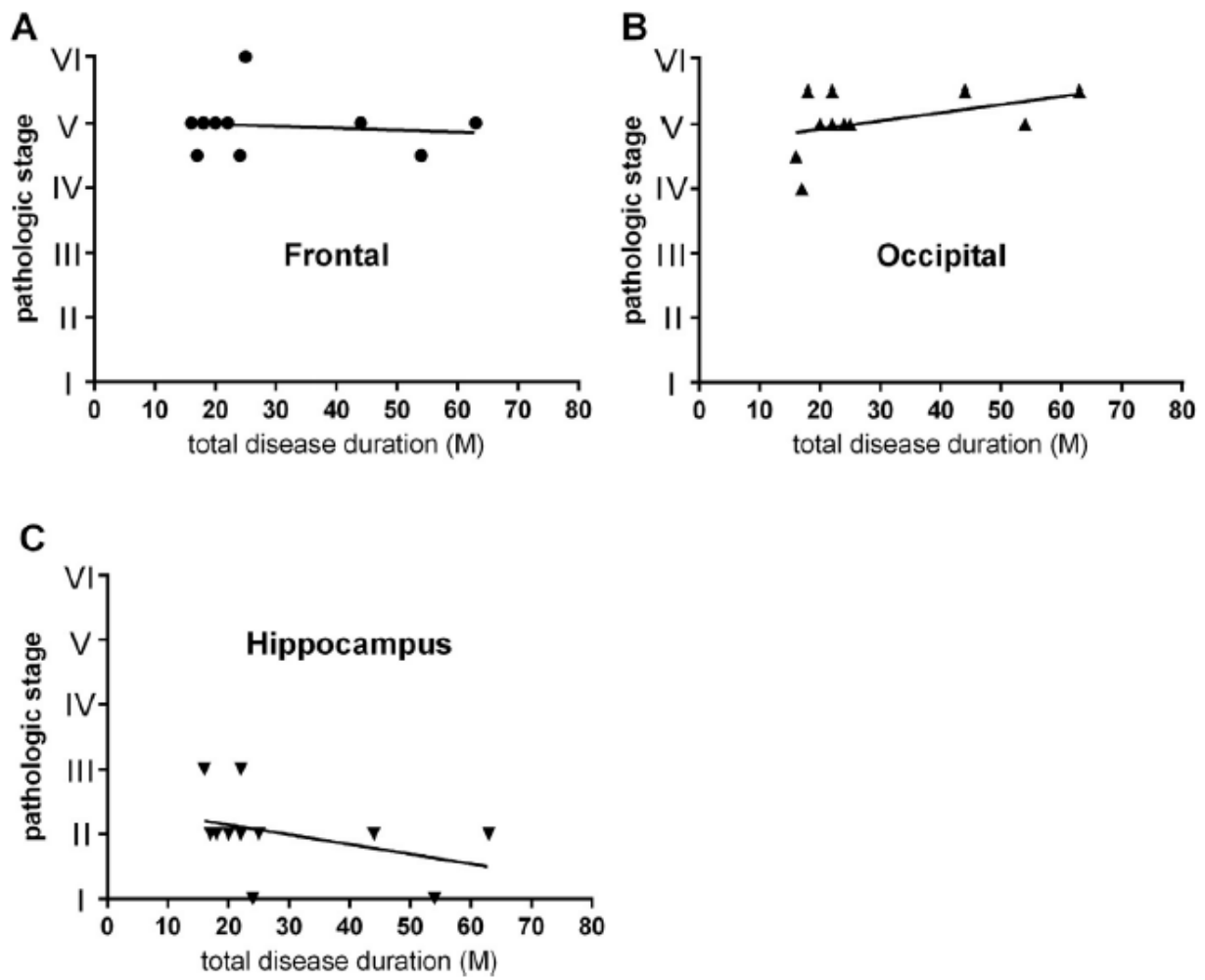


図4

